

This page Is Inserted by IFW Operations
And is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-103993

(P2001-103993A)

(43) 公開日 平成13年4月17日 (2001.4.17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/04		C 1 2 P 21/04	4 B 0 6 4
A 6 1 K 38/55		A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16		31/12	4 H 0 4 5
31/12		C 0 7 K 7/06	Z N A
C 0 7 K 7/06	Z N A	7/08	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-284875

(22) 出願日 平成11年10月5日 (1999.10.5)

(71) 出願人 000231109

株式会社ジャパンエナジー

東京都港区虎ノ門二丁目10番1号

(72) 発明者 三沢 悟

埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式会社ジャパンエナジー内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

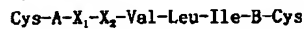
(54) 【発明の名称】 環状ペプチド及びセリンプロテアーゼ阻害剤

(57) 【要約】

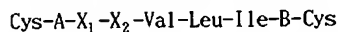
【課題】 環状ペプチド及びセリンプロテアーゼ阻害剤の提供。

【解決手段】 次式I:

【化1】



(I)

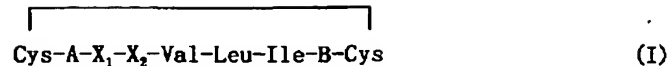


(I) (式

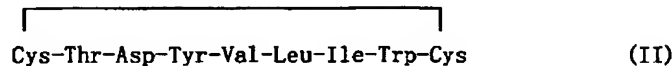
中、X₁はAsp、Ala、Glu又はArgを表し、X₂はTyr、Trp又はPheを表し、A及びBは同一又は異なり、直接結合又は1~13個のα-アミノ酸残基を表し、A及びBのアミノ酸残基の合計は0~13個である。)で示される環状ペプチド又はその塩。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式I:

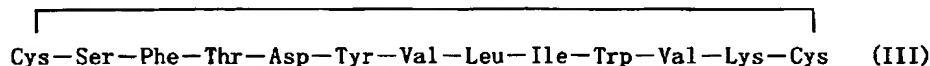


(式中、 X_1 はAsp、Ala、Glu又はArgを表し、 X_2 はTyr、Trp又はPheを表し、A及びBは同一又は異なり、直接結合又は1～13個のアミノ酸残基を表し、A及びBのアミノ酸残基の合計は0～13個である。)で示される環状ペプチド又はその塩。

【請求項2】 X_1 がAspである請求項1記載の環状ペプチ

で示される環状ペプチド又はその塩。

【請求項5】 次式III:



で示される環状ペプチド又はその塩。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか1項に記載の環状ペプチド及び/又はその塩の少なくとも1種を有効成分として含有することを特徴とするセリンプロテアーゼ阻害剤。

【請求項7】 請求項1～5のいずれか1項に記載の環状ペプチド及び/又はその塩の少なくとも1種を有効成分として含有することを特徴とするC型肝炎治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、環状ペプチドに関する。さらに、本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)由来のNS3セリンプロテアーゼの酵素活性を阻害することができるプロテアーゼ阻害剤及びC型肝炎治療剤に関する。

【0002】具体的には、本発明は、HCVのNS3プロテアーゼに対する抗体中の相補性決定領域(complementarity determining region; CDR)と同一又は類似するアミノ酸配列の両端にシステインを導入して環化した人為的なペプチドであり、特に、哺乳動物に免疫した際に産生される抗HCV NS3プロテアーゼIgG抗体と同様、当該HCV NS3プロテアーゼと結合して、その酵素活性を阻害する作用を持つC型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼ阻害剤に関する。

【0003】

【従来の技術】C型肝炎は、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus; HCV)の感染により引き起こされ、その感染経路は、血液を介した非経口感染であることが知られている。このHCVは、(+)鎖のRNAをゲノムとして有するRNAウイルスであり、宿主細胞中においてゲノム上の翻訳領域から、3,010アミノ酸からなる一本鎖のポリプロテイン

【化1】

ド又はその塩。

【請求項3】 X_2 がTyrである請求項1記載の環状ペプチド又はその塩。

【請求項4】 次式II:

【化2】

【化3】

ンが翻訳される。この一本鎖のポリプロテインは宿主細胞由来のシグナルペプチダーゼ、又はHCV由来のセリンプロテアーゼ(前記のゲノム上にコードされている。)により切断されて、それぞれの機能蛋白質となる。

【0004】なお、HCVは、上記2種類のプロテアーゼを産生しており、このうちHCV由来のセリンプロテアーゼはゲノム上において、NS3と呼ばれる領域にコードされるため、NS3蛋白質と呼ばれることもある。また、このNS3タンパク質は、631アミノ酸からなる70 kDaのタンパク質であり、その分子量からp70と呼ぶことも多い。

【0005】上記シグナルペプチダーゼ及びセリンプロテアーゼにより切断される箇所は合計8箇所存在する。このうち、宿主細胞由来のシグナルペプチダーゼは、計3箇所の切断を行い、HCV由来のメタロプロテアーゼが1箇所、HCV由来のセリンプロテアーゼは残る4箇所の切断を行う。この過程が、新たなHCVウイルス粒子の生成における初期過程である。従って、HCV由来のセリンプロテアーゼの酵素活性が阻害されると、宿主細胞内での新たなHCVウイルス粒子の生成が果たせないため、感染患者の肝臓組織における感染の拡大を抑えることができる。この観点から、HCV由来のセリンプロテアーゼに対する酵素活性阻害剤の探索・開発の研究が進められている。

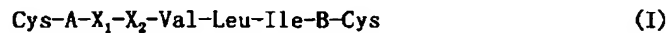
【0006】これらの酵素活性阻害剤の開発に際しては、阻害能を評価することが不可欠であり、そのために試験管内の酵素アッセイ系が利用されている。HCV由来のセリンプロテアーゼに関しても、酵素アッセイ系に利用できる組換え型のHCV NS3プロテアーゼ並びにその基質となる合成ペプチド又は組換え基質蛋白質が提案されている。加えて、相当に高い阻害能を有する基準となる阻害物質がこの種の評価の再現性を維持するには必要で

あり、既に、基準となる阻害物質になり得る、幾つかの化合物が報告されている。その一つとして、HCV NS3プロテアーゼに対する抗体であって、且つHCV NS3プロテアーゼと結合した際、その酵素活性を阻害する中和抗体と称されるものが報告されている。

【0007】本発明者らは、HCV由来セリンプロテアーゼに特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を創製し、更に、該抗体はHCV由来セリンプロテアーゼと結合することで、その酵素活性を強く阻害することを見出した（特開平9-206076号公報を参照）。

【0008】また、本発明者らはHCV NS3プロテアーゼに対する抗体中の相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）と同一又は類似するアミノ酸配列を有する人為的なペプチドが哺乳動物に免疫した際に産生される抗HCV NS3プロテアーゼIgG抗体と同じく、当該NS3プロテアーゼと結合し、その酵素活性を強く阻害することを見出した（特開平11-127861号を参照）。

【0009】現在では、阻害の機能においてこれらの中



【0013】（式中、 X_1 はAsp、Ala、Glu又はArgを表し、 X_2 はTyr、Trp又はPheを表し、A及びBは同一又は異なり、直接結合又は1～13個のアミノ酸残基を表し、A及びBのアミノ酸残基の合計は0～13個である。）で示される環状ペプチド又はその塩である。上記ペプチドとし

和抗体と等価であり、中和抗体に代えて基準となる阻害物質として利用できる低分子量の化合物が望まれている。特に、簡便な合成により純品を得ることができ、且つ保存の容易な低分子量の阻害物質の提案が望まれるものである。さらに、これら抗体の低分子化による抗HCV薬のリード化合物としての開発が望まれている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、環状ペプチド並びにセリンプロテアーゼ阻害剤及びC型肝炎治療剤を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、強力なNS3プロテアーゼ阻害活性を有する環状ペプチドを作製することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、次式I:

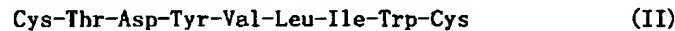
【0012】

【化4】

ては、例えば X_1 がAspのもの又は X_2 がTyrのものが挙げられる。さらに、本発明は、次式II:

【0014】

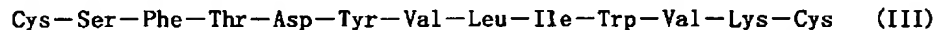
【化5】



【0015】で示される環状ペプチド又はその塩である。さらに、本発明は、次式III:

【0016】

【化6】



【0017】で示される環状ペプチド又はその塩である。さらに、本発明は、上記環状ペプチド及び/又はその塩の少なくとも1種を有効成分として含有することを特徴とするセリンプロテアーゼ阻害剤又はC型肝炎治療剤である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0018】

【発明の実施の形態】一般に、抗体のL鎖及びH鎖に存在するCDRは、通常 β -ターン構造を形成しており、それぞれのCDRループが抗原との結合に重要な役割を果たしている。一方、HCV NS3プロテアーゼと特異的に結合する抗体（mAb 8D4抗体）が知られており、該抗体は、H鎖の可変領域に3箇所の相補性決定領域（CDR）の一つであるCDR-H1と呼ばれる領域を有している。従って、本発明者は、mAb 8D4のCDR-H1ペプチドの両端にシステインを導入し、分子内でS-S結合を形成させて、抗体本来の β -ターン構造を形成させれば、結合活性の向上を図る

ことができ、結果として酵素阻害活性も上昇するはずであるとの着想を得た。

【0019】本発明は、かかる知見により創成されたものである。すなわち、本発明は、HCVのNS3プロテアーゼに対する抗体中の相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）と同一又は類似するアミノ酸配列の両端にシステインを導入し、これを環状化した新規な環状ペプチドである。そして、該ペプチドは化学的なペプチド合成ができる程度の鎖長を有するものである。実際に、かかる環状化ペプチドを作製し、NS3プロテアーゼ阻害活性を測定したところ、該環状ペプチドの活性は直鎖状ペプチドよりも20倍以上強くなることを確認した。

【0020】また、本発明の環状ペプチドは、哺乳動物に免疫した際に産生される抗HCV NS3プロテアーゼIgG抗体と同様、当該HCV NS3プロテアーゼと結合して、その

酵素活性を阻害する作用を有するため、C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼ阻害剤として利用することができる。従って、本発明は、阻害の機能において中和抗体と等価であり、NS3プロテアーゼと結合して、その酵素活性を阻害する作用を持ち、抗体本来のCDRのβ-ターン構造を形成させて、阻害活性を向上させたC型肝炎ウイルス

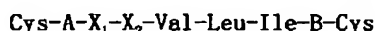
NS3プロテアーゼ阻害剤である。

1. 環状ペプチドの調製

本発明の環状ペプチドは、次式I:

【0021】

【化7】



(I)

【0022】で示される。ここで、上記式Iのうち「X₁-X₂-Val-Leu-Ile」で示される領域（配列番号1）は、NS3プロテアーゼのエピトープ部位、すなわち、mAb 8D4抗体の認識部位である。本発明においては上記認識部位を「コア領域」と呼ぶこともある。また、上記コア領域のアミノ酸配列において、X₁はAsp、Ala、Glu又はArgであり、X₂はTyr、Trp又はPheである。

【0023】本発明のペプチドは、mAb 8D4抗体のH鎖のCDR-H1に相当する5つのアミノ酸からなるアミノ酸配列（式I；コア領域）を含み、全鎖長が7～20アミノ酸であり、CysとCysとの間でS-S結合を介した環状のものである。上記コア領域は、HCV NS3プロテアーゼと特異的に結合するmAb 8D4抗体のH鎖の可変領域に存在する3箇所の相補性決定領域（CDR）の一つであるCDR-H1であり、上記式IIに記載のアミノ酸配列と同一又はその一部のアミノ酸を改変したものである。従って、本発明の環状ペプチドは、mAb 8D4抗体のH鎖が結合するNS3プロテアーゼ上の特定の部位（エピトープ部位）を共通にしている。後述する実施例において示すとおり、本発明の環状ペプチドは、元となったmAb 8D4抗体と同様優れた結合能を有し、その結果、NS3プロテアーゼの酵素活性を阻害する効果も秀でてい

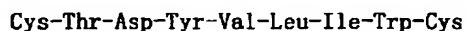
ため、同じ構造を有するマウスのIgG1抗体の対応する断片を利用しても、形状自体はほぼ同じものとなる。これは抗体自体に固有な相補性決定領域の違いを除くと、分子の形状は、本質的に同種サブクラスに属する抗体相互では極めて類似したものとなることを利用したものである。上記式Iにおいて、アミノ酸残基はα-アミノ酸が好ましい。

【0026】さらに、式Iにおいて、A及びBは同一のアミノ酸配列を有しても、異なるアミノ酸配列を有してもよく、さらに、A及び/又はBが存在しない状態、すなわちCysとX₁、及び/又はIleとCysとが直接結合をしていてもよい。A及びBは1～13個のα-アミノ酸残基を表し、A及びBのアミノ酸残基の合計は0～13個である。従って、式Iに示される環状ペプチドは、7個から20個のアミノ酸を有するものである。本発明では、コア領域のアミノ酸配列の両側にそれぞれ3～7、特に5～7のアミノ酸を付加し、全長を11～18のアミノ酸とするのが好ましく、13～17アミノ酸とするのがさらに好ましい。但し、式IのAに含まれるアミノ酸残基の数とBに含まれるアミノ酸残基の数とは同程度の数になることが好ましい。従って、Aのアミノ酸残基が3個の場合はBのアミノ酸残基の数は2個～4個程度とし、Aのアミノ酸残基が6個の場合はBのアミノ酸残基の数は5個～7個程度とすることが好ましい。

【0027】なお、本発明のペプチドは、式IのCys同士が分子内でS-S結合により結合し、環状化されているため、本発明の環状ペプチドを、「シクロ[Cys-A-X₁-X₂-Val-Leu-Ile-B-Cys]」と表す場合もある。具体的には、式Iにおいて、X₁がAspのもの、すなわちシクロ[Cys-A-Asp-X₂-Val-Leu-Ile-B-Cys]（X₂は前記と同様である。）、X₂がTyrのもの、すなわちシクロ[Cys-A-X₁-Tyr-Val-Leu-Ile-B-Cys]（X₁は前記と同様である。）が挙げられる。さらに、式IにおいてX₁がAsp、X₂がTyr、AがThr-Asp、及びBがTrpの場合は、次式II:

【0028】

【化8】



(II)

【0029】で示される環状ペプチド（シクロ[Cys-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-Cys]）となり（配列番号

2）、式IにおいてX₁がAsp、X₂がTyr、AがSer-Phe-Thr、及びBがTrp-Val-Lysの場合は、次式III:

【0030】

【化9】

Cys—Ser—Phe—Thr—Asp—Tyr—Val—Leu—Ile—Trp—Val—Lys—Cys (III)

【0031】で示される環状ペプチド（シクロ[Cys—Ser—Phe—Thr—Asp—Tyr—Val—Leu—Ile—Trp—Val—Lys—Cys]）となる（配列番号3）。

【0032】本発明の環状ペプチドはペプチド合成の常法手段で製造することができる。この場合、液相合成法及び固相合成法のいずれを用いることもできる。このようなペプチド合成の手段は、任意の公知の方法に従えばよい（例えばBodanszky, M and M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966), Schroeder and Luebeck, The Peptide, Academic Press, New York (1965), F. M. Finn 及びK. Hofmann 著, The Proteins, 第2巻, H.Nenrath, R. L. Hill 編集, Academic Press Inc., New York (1976) ; 泉屋信夫他著「ペプチド合成の基礎と実験」丸善(株) 1985年 ; 矢島治明、榊原俊平他著、生化学実験講座1、日本生化学会編、東京化学同人 1977年 ; 木村俊他著、続生化学実験講座2、日本生化学会編、東京化学同人 1987年などを参照）。従って、例えばアジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混酸無水物法、DCC法、活性エステル法、ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボニルイミダゾール法、酸化還元法、DCC/HONB法、BOP試薬を用いる方法などにより、本発明のペプチドを得ることができる。通常は、自動ペプチド合成装置（PEアプライドバイオシステムズ社等）により化学合成することも可能である。

【0033】本発明の環状ペプチドは、そのペプチド結合の任意の位置で2分される2種のフラグメントの一方に相当する反応性カルボキシル基を有する原料と、他方のフラグメントに相当する反応性アミノ基を有する原料とを縮合させ、ついで生成物のC末端 α -カルボキシル基およびN末端 α -アミノ基の保護基を同時にまたは段階的に除去したのち、この両者を公知の縮合方法により分子内で縮合し環状化合物を得、さらに生成物が保護基を有する場合、その保護基を常套手段で脱離することにより製造することができる。

【0034】「反応性カルボキシル基」とは、カルボキシル基そのもの又は活性化されたカルボキシル基を意味する。また「反応性アミノ基」とは、アミノ基そのもの又は活性化されたアミノ基を意味する。通常は、上記縮合に作用する2つの官能基の内の一方が活性化されている。縮合反応に関与しないカルボキシル基及びアミノ基は縮合反応を行う前に保護すればよい。

【0035】原料のアミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシカルボニル、ターシャリーブチルオキシカルボニル、ターシャリーアミルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、

フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニルなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、例えばアルキルエステル（メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどのエステル基）、ベンジルエステル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブチルオキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

【0036】縮合反応は、溶媒の存在下に行うことができる。溶媒としては、例えば無水又は含水のジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン、クロロホルム、ジオキサン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、酢酸エチル若しくはN-メチルピロリドン又はこれらの適宜の混合物などが挙げられ、適宜選択することができる。反応温度は、ペプチド結合形成反応に使用されうることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～30℃の範囲で行う。

【0037】保護基の脱離方法としては、例えば① Pd黒又はPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中の接触還元、② 無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸又はこれらの混合液などによる酸処理、③ 液体アンモニア中ナトリウムによる還元などが挙げられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に-20℃～40℃の温度で行うことができる。

【0038】分子内環化反応は、CysとCysの間を公知の方法でS-S結合させることにより、行なうことができる。すなわち、上記で得られた直鎖状ペプチドを溶液中で、DTNB(5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸))等により、あるいは銅等の金属触媒の存在下での空気酸化により、環化することができる。

【0039】このようにして製造された環状ペプチドは、反応終了後、ペプチドの分離精製手段、たとえば、溶媒抽出、蒸留、分配、再沈殿、再結晶、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーなどを組み合わせて採取される。

【0040】本発明の環状ペプチドは、上記の金属塩、塩基又は塩基性化合物との塩、無機酸付加塩、有機酸塩などとして得ることができる。特に、薬理学的に許容される酸付加塩、例えば無機酸又は有機酸との塩としても得ることができる。酸付加塩としては、例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸などの無機酸との塩、あるいは酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香

酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩が挙げられる。塩基性塩としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウムなどの無機塩基との塩、あるいはカフェイン、ピペリジン、トリメチルアミン、ピリジンなどの有機塩基との塩が挙げられる。金属塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などが挙げられる。

【0041】塩は、塩酸などの適切な酸、又は水酸化ナトリウムなどの適切な塩基を用いて調製することができる。例えば、水中、又はメタノール、エタノール若しくはジオキサンなどの不活性な水混和性有機溶媒を含む液体中で、標準的なプロトコルを用いて処理することにより調製し得る。なお、処理温度は0〜100℃であるが、室温が好ましい。なお、本発明のペプチドの生化学的、物理化学的性質は、質量分析、核磁気共鳴、電気泳動、高速液体クロマトグラフィー等により分析することができる。

【0042】2. プロテアーゼ阻害剤

本発明の環状ペプチドは、*in vitro*のNS3プロテアーゼ酵素アッセイ系における標準阻害物質として利用でき、抗体自体より取り扱いが格段に容易であり、また、阻害機構は、酵素蛋白質と分子間結合を形成するため、極めて再現性の高い阻害活性が得られる。さらに、当該環状ペプチドは、一般の試薬類と同様、長期保存が可能である。さらに、アミノ酸配列を任意に設計できることから、その配列に応じた分子量が分かるため、濃度調製が容易である。

【0043】さらに、本発明の環状ペプチドは、 β -ターン構造を模倣したため、このペプチド自身、これらの低分子化合物をデザイン合成したペプチド、これらペプチドの塩、あるいはこれらペプチドとその塩との混合物は、NS3プロテアーゼ阻害剤又はC型肝炎治療剤若しくは抗HCV剤として有用である。

【0044】本発明のペプチドをC型肝炎治療剤又は抗HCV剤として使用する場合は、使用する対象を特に限定するものではない。例えば、C型肝炎患者について治療又は予防を特異目的として用いることができる。これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよく、いずれも本発明のペプチドの使用の対象とすることができる。

【0045】また、本発明の治療剤は、経口又は非経口的に全身又は局所投与することができる。本発明の治療剤を経口投与する場合は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ剤、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等のいずれのものであってもよく、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。また、本発明

の治療剤を非経口投与する場合は、静脈内注射（点滴を含む）、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐剤などの製剤形態を選択することができ、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供される。

【0046】これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤などを適宜選択し、常法により製造することができる。

【0047】上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアガム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤型に応じて上記の中から適宜又は組み合わせで選択される。

【0048】本発明の治療剤の投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。この場合、本発明のタンパク質の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体との組合せとして投与される有効量は、一回につき体重1kgあたり0.0001〜1000mg/bodyの範囲の投与量を選ぶことができ、1日1回から数回に分けて1日以上投与される。

【0049】

【実施例】以下、実施例に基づき本発明のHCV由来のNS3セリンプロテアーゼ阻害剤について詳しく説明する。

〔実施例1〕環状ペプチドの合成

mAb 8D4のCDR-H1の配列をもとに、4種類の鎖長の異なる環状ペプチドを合成した（表1）。合成は、マルチプルペプチド合成機（SYROII、Fmoc法）を用いて直鎖状のアミノ酸を合成し、DTNBを用いて環状とした後、HPLC（カラム：Kromasil 100 C18 5 μ m 125 \times 4mm、温度：20℃、流量0.75ml、バッファー：A；0.1%TFA水溶液 B；0.1%TFA水-アセトニトリル（20/80）溶液、グラディエント：20%→80%/30分、検出：215nm）により精製した。これら4種類のペプチドのHPLCクロマトグラム及びTOP-MSチャートを図1〜8に示した。

【0050】

【表1】

表1 合成した環状CDR-H1 ペプチドのアミノ酸配列

1) CDR-H1C17 (17 mer) (配列番号4) MW: 2010.2

H-Cys-Gly-Tyr-Ser-Phe-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-Val-Lys-Gln-Ser-Cys-OH

HPLC クロマトグラム: 図1

TOP-MS チャート: 図2

2) CDR-H1C13 (13 mer) (配列番号3) MW: 1574.0

H-Cys-Ser-Phe-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-Val-Lys-Cys-OH

HPLC クロマトグラム: 図3

TOP-MS チャート: 図4

3) CDR-H1C9 (9 mer) (配列番号2) MW: 1143.9

H-Cys-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-Cys-OH

HPLC クロマトグラム: 図5

TOP-MS チャート: 図6

4) CDR-H1C7 (7 mer) (配列番号5) MW: 847.9

H-Cys-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Cys-OH

HPLC クロマトグラム: 図7

TOP-MS チャート: 図8

【0051】〔参考例1〕NS3プロテアーゼの精製及び活性の測定

1. His₆-NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼ発現ベクターの構築
特開平09-9961号公報に記載したHCV NS3プロテアーゼドメイン発現ベクターを鋳型として、以下に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRにより6残基のHisタグをN末端に付加するようデザインした、NS3のN末端190アミノ酸に対応するHis₆-NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼ遺伝子を増幅した。PCRはPTC-100™ Programmable Thermal Controller (銀ブロック, MJ Research Inc.製)を用い、以下の条件で実施した。

【0052】Step 1: 95°C, 30秒→Step 2: 95°C, 30秒→Step 3: 55°C, 45秒→Step 4: 72°C, 1分→Step 5: Step 2→Step 4を25回繰り返して→Step 6: 72°C, 7分→Step 7: 4°C, 洗浄

His-tag フォワードプライマー

5'-GC GAA TTC ATG CAT CAC CAT CAC GCG CCT
ATC ACG GCC TAT TCC CAA C-3' (配列番号6)

(下線部はEcoRI部位)

NS3 (1-190) リバースプライマー

5'-GCA AGC TTA AGG GGA TGA GTT GTC TGT GAA GAC CGG
AGA-3' (配列番号7)

(下線部はHindIII部位)

【0053】アガロースゲル電気泳動によりPCR増幅産物を確認した後、NS3プロテアーゼ遺伝子断片をQIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN製)で精製した。精製したDNA断片をTA cloningベクターpT7Blue(R) (Novagen製)にDNA Ligation Kit (宝酒造製)を用いて連結した後、大腸菌JM109を形質転換した。X-galを塗布したLB/アンピシリンプレートに生育した形質転換体のうち、白色コロニーをPCRスクリーニングに供し、インサートDNAを有する陽性クローンを選んだ。

【0054】陽性クローンよりQIAGEN Plasmid Mini Kits (QIAGEN-tip 20)を用いてプラスミドを調製し、BcaBEST™ DNA Sequencing Kit (宝酒造)を用いたマニュアルシーケンシングおよびThermo Sequenaseを有するCycle Sequencing Kit (Amersham)を用いたオートマチックシーケンシング(DSQ-1 DNA Sequencer, 島津製作所)によりHis₆-NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

【0055】正しい塩基配列を有する遺伝子断片をEcoRI-HindIII切断により調製し、大腸菌高発現ベクターpMT1のEcoRI-HindIII部位に連結し、His₆-NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼ発現ベクターpMTHNS3-2を構築した。

【0056】2. NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼの活性型での発現

NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼ生産菌(JM109/pMTHNS3-2)を100 mlのM9/カザミノ酸/アンピシリン培地を含む500ml容三角フラスコにて、20°Cで15時間培養後、終濃度25 μ g/mlとなるようにインドールアクリル酸(IAA)を添加して発現誘導を行った。IAA添加8時間後に集菌し、菌体を5mlのSonication Buffer (50 mMトリス塩酸, pH 7.5/300 mM NaCl/10%グリセロール)に懸濁して超音波破碎した。18,000rpmで30分遠心した上清のNS3プロテアーゼ活性をHPLCを用いたアッセイ系により測定した。

【0057】NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼの大量調製を行うために、組換え菌を200mlのM9/カザミノ酸/アンピシリン培地を含む500ml容三角フラスコ18本(計3.6 L)で培養し、菌体を20 mMイミダゾールを添加したSonication Bufferに懸濁して菌体ライセートを調製した。

【0058】3. NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼの精製

(1) Ni-NTA Superflowアフィニティクロマトグラフィー

3.6 Lの培養菌体由来180mlの菌体ライセートを以下に示す条件でカラムクロマトグラフィーを行った。カラムからの溶出はイミダゾールの直線濃度勾配により行った。

【0059】①カラム: 2.2×2.7 cm = 10ml

②流速: 378ml/h (100 cm/h, 菌体ライセートアブライ時)、200ml/h (53 cm/h, グラジエント溶出時)

③分画: 2ml/0.6 min/tube (50本)

④バッファー:

a. 50 mMトリス塩酸, pH 7.5/300 mM NaCl/20 mMイミダゾール/10%グリセロール/0.5% CHAPS, 50ml

b. 50 mMトリス塩酸, pH 7.5/300 mM NaCl/350 mMイミダゾール/10%グリセロール/0.5% CHAPS, 50ml

⑤検出波長: 280 nm (Full scale 0.5)

【0060】(2) S-Sepharose Fastflow陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

Ni-NTAカラム溶出画分をYM-10で濃縮後、平衡化バッファー(50 mMトリス塩酸, pH 7.5/10%グリセロール/0.5% CHAPS)で25倍に希釈し、以下に示す条件でカラムクロマトグラフィーを行った。カラムからの溶出はNaClの直線濃度勾配により行った。

【0061】①カラム: 1.8×3.94 cm = 10ml

②流速: 254ml/h (100 cm/h)

③分画: 2ml/0.47 min/tube (100本)

④バッファー:

a. 50 mMトリス塩酸, pH 7.5/10%グリセロール/0.5% CHAPS

APS

b. 50 mMトリス塩酸, pH 7.5/500 mM NaCl/10%グリセロール/0.5% CHAPS

⑤検出波長: 280 nm (Full scale 0.5)

【0062】SDS-PAGE(銀染色)によりNS3₁₋₁₉₀プロテアーゼを含む画分をブールし、YM-10で濃縮後、平衡化バッファーで4倍に希釈した。さらにYM-10(25 mm)により約1 mg/mlまで濃縮し、90%グリセロールを等量(終濃度50%)混合して-80°Cに保存した。

【0063】3.6 Lの培養菌体より得られた菌体ライセートをNi-NTAカラムにアブライし、吸着したNS3₁₋₁₉₀プロテアーゼをイミダゾールの直線濃度勾配により溶出させた。この場合、溶出液に終濃度0.5% CHAPSを添加することにより、以後の操作でNS3₁₋₁₉₀プロテアーゼを濃縮しても凝集しないことが判明した。図9に溶出画分のSDS-PAGEによる純度分析の結果を示す。

【0064】図9において、各レーンは以下の通りである。

レーンa: JM109/pMTHNS3-2可溶性画分

レーンb: カラム素通り画分

レーン12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36: イミダゾール溶出画分(各フラクション番号に対応する)

【0065】さらに、S-Sepharose陽イオン交換カラムにより、NS3プロテアーゼを高純度に精製した(図10)。図10において、aはNi-NTAカラム溶出画分、レーン42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58及び60は、NaClグラジエント溶出画分(各フラクション番号に対応する)である。

【0066】最終的に3.6 Lの培養菌体から1.66 mgの精製標品が得られた。本酵素の活性を従来のアッセイ条件で測定すると、酵素濃度が低くなると極端に活性が低下することが確認されたため、酵素の希釈は10 mMリン酸ナトリウム, pH 7.2/50%グリセロール/0.5% CHAPSで行い、アッセイ系に終濃度2% CHAPSを添加して活性測定を行った結果、濃度依存的な活性が得られた。表2に精製のまとめを示す。また、各精製ステップにおけるSDS-PAGEによる純度分析の結果を図11に示す。図11において、各レーンは以下の通りである。

【0067】

レーン1: JM109/pMT1全菌体タンパク質

レーン2: JM109/pMTHNS3-2全菌体タンパク質(+IAA)

レーン3: JM109/pMTHNS3-2可溶性画分

レーン4: JM109/pMTHNS3-2不溶性画分

レーン5: Ni-NTAカラム溶出画分

レーン6: S-Sepharoseカラム溶出画分

【0068】

【表2】

NS3₁₋₁₉₀ プロテアーゼの精製のまとめ

段階	総タンパク質 (mg)	全活性 (Area)	比活性 (Area/mg)	収率 (%)
細胞溶解物	N. D. *	2.22×10^9	N. D. *	100
Ni-NTA Superflow	5.06	1.06×10^9	2.09×10^8	47.5
S-Sepharose FF	1.66	3.88×10^8	2.34×10^8	17.4

*測定せず

【0069】4. NS3プロテアーゼ阻害活性測定系
以下に示す組成の試薬を用いて、HCVプロテアーゼ活性中和抗体のNS3プロテアーゼ活性ドメイン (NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼ) に対する阻害活性をNS4Aペプチド添加・無添加で評価した。なお、NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼは10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.2/50%グリセロール/0.5% CHAPS で希釈しており、NS5A/5B切断配列を有する合成基質 (S3) は50 mMトリス塩酸, pH 8.5/30 mM NaCl/5 mM CaCl₂

/25 mM DTTに溶解している。よって、反応組成は終濃度5%グリセロール、5 mM DTT、1 mM CaCl₂という条件になっている。強い阻害活性を有するmAbについてはTight binding inhibitorの数学的モデル式 (J. W. Williams and J. F. Morrison, Methods Enzymol., 63, 437-467 (1979)を参照) から阻害定数を求めた。

【0070】

(1) NS4Aペプチド無添加のアッセイ系

50 mMトリス塩酸, pH 8.5/30 mM NaCl (TS buffer)	40 μ l
TS buffer+10% CHAPS	20 μ l
380 nM NS3 ₁₋₁₉₀ プロテアーゼ	10 μ l
	70 μ l

↓
室温で10分間ブレインキュベーション
↓
TS bufferで希釈した種々の濃度のmAbを10 μ l添加
↓
室温で10分間インキュベーション
↓
1 mM合成基質 (S3) を20 μ l添加
↓
37°Cで1時間インキュベーション
↓
0.5% TFAを100 μ l添加して反応停止
↓
20 μ lをHPLCにて分析

【0071】

(2) NS4Aペプチド添加のアッセイ系

50 mMトリス塩酸, pH 8.5/30 mM NaCl (TS buffer)	38 μ l
TS buffer+10% CHAPS	20 μ l
0.75 mM NS4Aペプチド	2 μ l
380 nM NS3 ₁₋₁₉₀ プロテアーゼ	10 μ l
	70 μ l

↓
室温で10分間ブレインキュベーション
↓
TS bufferで希釈した種々の濃度のmAbを10 μ l添加
↓

室温で10分間インキュベーション
 ↓
 0.125 mM合成基質 (S3) を20 μ l添加
 ↓
 37°Cで15分間インキュベーション
 ↓
 0.5% TFAを100 μ l添加して反応停止
 ↓
 20 μ lをHPLCにて分析

【0072】その結果、図12-Aに示すようにNS4Aペプチドを添加しない系においてmAb 8D4が用量依存的な強い阻害を示した (IC_{50} = 27.8 nM)。また、mAb 7E3および7E9も弱いながら用量依存的な阻害を示した (7E9: IC_{50} = 203.1 nM)。一方、NS3プロテアーゼ活性ドメインを認識しない抗NS3抗体mAb 5E12は全く阻害を示さなかったことから、NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼを用いることにより活性ドメインを認識する抗体のみが阻害を示す評価系を構築することができた。

【0073】すでにmAb 7E3, 7E9, 8D4はNS4Aペプチド存在下においてMBP-p70に対する阻害活性が低下することが確認されている。今回、NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼの場合もNS4Aペプチド存在下での阻害活性を評価した結果、低濃度域では図12-Bに示すようにいずれの抗体もほとんど阻害を示さなかったが、高濃度域では図13に示すように用量依存的な阻害を示した (IC_{50} =2.6 μ M)。すなわち、IgGの場合はNS4Aペプチド存在下ではmAb8D4の阻害活性は約90分の1に低下することが判明した。

【0074】mAb 8D4はNS4A非存在下においてNS3₁₋₁₉₀プロテアーゼをモル比1:1で約50%の阻害活性を示すことから、Tight-bindingの式にFittingして阻害定数を求めた。その結果、図14に示すように K_i = 5.4 nMという強い阻害活性を有することが判明した。

【0075】〔実施例2〕 本発明の環状ペプチドによるHCVプロテアーゼ阻害活性評価

実施例1で調製した環状ペプチドを用いて、NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼに対する阻害活性を、NS4Aペプチド添加・無添加で評価した。mAbの場合PBSに溶解して10分の1量添加していたが、CDRペプチドの場合はDMSOに溶解し、50分の1量 (終濃度2% DMSO) 添加し、TS バッファーで反応液量を調整した。また、比較のために、前記環状ペプチドの1)、3)、4)に相当する直鎖状ペプチド (表3に示した) についても、同様に阻害活性を評価した。

【0076】

【表3】

5) CDR-H1-15 (15 mer) MW: 1806.0

H-Gly-Tyr-Ser-Phe-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-Val-Lys-Gln-Ser-OH

(配列番号 8)

6) CDR-H1-7 (7 mer) MW: 909.6

H-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-OH (配列番号 9)

7) CDR-H1-5 (5 mer) MW: 622.2

H-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-OH (配列番号 10)

【0077】阻害を示すペプチドについてはLineweaver-BurkプロットならびにDixonプロットにより阻害様式および阻害定数を求めた。その結果を、図15に示す。図15-A及びBは、それぞれNS4Aペプチド非存在下、存在下におけるNS3プロテアーゼ阻害活性試験結果を示す。

【0078】NS4Aペプチドの有無にかかわらず、CDR-H1 C13ペプチド (13 mer) は、表3の直鎖状ペプチドに比べて20倍以上強い阻害活性を示すことが確認された (IC_{50} = 1~3 μ M)。また、CDR-H1C17 (17 mer) およびCDR-H1C9 (9 mer) ペプチドは弱いながら用量依存的な阻害を示した (IC_{50} = 20~40 μ M)。

【0079】CDR-H1C13の阻害様式を調べた結果、Lineweaver-Burkプロットより図16に示すように非競争阻害を示す結果が得られた。図16-A、Bは、それぞれNS4Aペプチド非存在下及び存在下におけるNS3プロテアーゼに対する阻害様式解析結果を示す。

【0080】さらに、Dixonプロットの結果、NS4Aペプチド無添加の場合は K_i = 0.9 μ M、NS4Aペプチド添加 (15 μ M) の場合は K_i = 1.5 μ Mという値が得られ、NS4Aペプチドの有無に関わらず比較的強い阻害活性を有することが判明した (図17)。図17-A、Bは、それぞれNS4Aペプチド非存在下及び存在下におけるNS3プロテアーゼ

に対する阻害定数の解析結果を示す。

【0081】さらに、図18に示すように、CDR-H1C9はバキュロウイルス発現系により昆虫細胞で発現させた完全長NS3/4Aプロテアーゼ複合体に対しても比較的強い阻害活性を示すことが確認された ($IC_{50} = 17.8 \mu M$)。つまり、CDR-H1C9の β -ターン構造を模倣した低分子化合物をデザイン合成することにより、抗HCV剤としての開発が可能になると考えられる。

【0082】

【発明の効果】本発明により、環状ペプチド並びにセリンプロテアーゼ阻害剤及びC型肝炎治療剤が提供される。本発明の環状化ペプチドは、直鎖状ペプチドに比べ

てHCVセリンプロテアーゼの活性を阻害する能力に優れ、加えて、ペプチド鎖長は20アミノ酸以下の短鎖であるため、化学的合成により容易に合成することができる。

【0083】更に、本発明の環状ペプチドは、HCVセリンプロテアーゼの活性中心あるいはその近傍に結合するに際し、HCVセリンプロテアーゼと結合したNS4Aペプチド断片が存在する場合にも、元になった抗体とは異なり、当該プロテアーゼの基質ペプチドと同様に結合部位に容易に到達することが可能である。

【0084】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<;110>; JAPAN ENERGY CORPORATION
<;120>; Circular peptide

<;130>; P99-0451
<;140>;
<;141>;
<;160>; 10
<;170>; PatentIn Ver. 2.0
<;210>; 1
<;211>; 5
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;220>;
<;221>; PEPTIDE
<;222>; 1
<;223>; Xaa represents Asp, Ala, Glu or Arg
<;220>;
<;221>; PEPTIDE
<;222>; 2
<;223>; Xaa represents Tyr, Trp or Phe
<;400>; 1
Xaa Xaa Val Leu Ile
      1           5
<;210>; 2
<;211>; 9
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;400>; 2
Cys Thr Asp Tyr Val Leu Ile Trp Cys
      1           5
<;210>; 3
<;211>; 13
<;212>; PRT

```

```

<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;400>; 3
Cys Ser Phe Thr Asp Tyr Val Leu Ile Trp Val Lys Cys
    1             5             10
<;210>; 4
<;211>; 17
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;400>; 4
Cys Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Val Leu Ile Trp Val Lys Gln Ser
    1             5             10             15
Cys
<;210>; 5
<;211>; 7
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;400>; 5
Cys Asp Tyr Val Leu Ile Cys
    1             5
<;210>; 6
<;211>; 54
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 6
gcgaattcat gcaccacat caccatcac gcctatcac ggctattcc caac      54
<;210>; 7
<;211>; 39
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 7
gcaagcttaa gggatgagt tgtctgtgaa gaccggaga      39
<;210>; 8
<;211>; 15
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;400>; 8
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Val Leu Ile Trp Val Lys Gln Ser
    1             5             10             15

```

```

<;210>; 9
<;211>; 7
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;400>; 9
Thr Asp Tyr Val Leu Ile Trp
  1                      5
<;210>; 10
<;211>; 5
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic peptide
<;400>; 10
Asp Tyr Val Leu Ile
  1                      5

```

【 0085】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 合成ペプチド

配列番号 1 : XaaはAsp、Ala、Glu又はArgを表す (存在位置 : 1)。

配列番号 1 : XaaはTyr、Trp又はPheを表す (存在位置 : 2)。

配列番号 2 : 合成ペプチド

配列番号 3 : 合成ペプチド

配列番号 4 : 合成ペプチド

配列番号 5 : 合成ペプチド

配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

配列番号 8 : 合成ペプチド

配列番号 9 : 合成ペプチド

配列番号 10 : 合成ペプチド

【図面の簡単な説明】

【図1】環状ペプチドCDR-H1C17(17mer)のHPLCクロマトグラム。

【図2】環状ペプチドCDR-H1C17(17mer)のTOP-MSチャート。

【図3】環状ペプチドCDR-H1C13(13mer)のHPLCクロマトグラム。

【図4】環状ペプチドCDR-H1C13(13mer)のTOP-MSチャート。

【図5】環状ペプチドCDR-H1C9(9mer)のHPLCクロマトグ

ラム。

【図6】環状ペプチドCDR-H1C9(9mer)のTOP-MSチャート。

【図7】環状ペプチドCDR-H1C7(7mer)のHPLCクロマトグラム。

【図8】環状ペプチドCDR-H1C7(7mer)のTOP-MSチャート。

【図9】Ni-NTAカラムクロマトグラフィーによるカラム溶出画分のSDS-PAGEによる純度分析結果。

【図10】S-Sepharose陽イオン交換カラムによるNS3₁₋₁₉₀プロテアーゼの高純度精製結果。【図11】各精製ステップにおけるNS3₁₋₁₉₀プロテアーゼのSDS-PAGEによる純度分析。【図12】NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼに対する各種mAbの阻害活性。

【図13】NS4Aペプチド存在下でのmAb8D4の阻害活性。

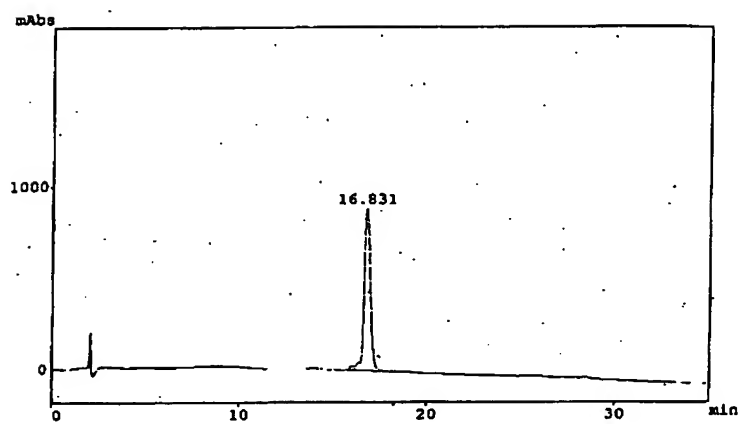
【図14】Tight-bindingの式にFittingして求めたmAb8D4のNS3₁₋₁₉₀プロテアーゼに対する阻害定数。【図15】NS3₁₋₁₉₀プロテアーゼに対する各種環状CDR-H1ペプチドの阻害活性。

【図16】Lineweaver-Burkプロットによる環状ペプチドCDR-H1C13の阻害様式。

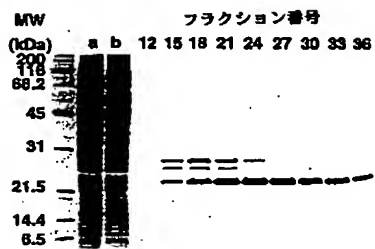
【図17】Dixonプロットによる環状ペプチドCDR-H1C13の阻害定数評価。

【図18】完全長NS3/4Aプロテアーゼ複合体に対する環状ペプチドCDR-H1C9の阻害活性。

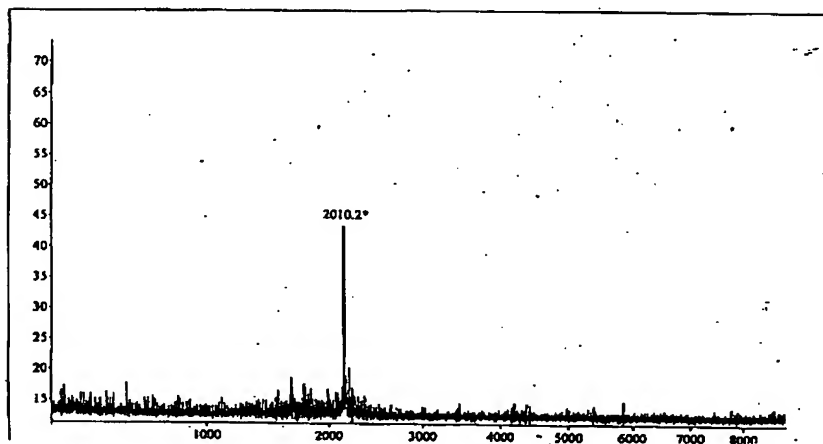
【図1】



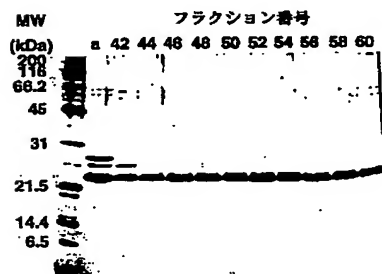
【図9】



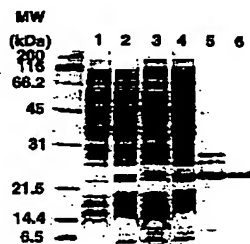
【図2】



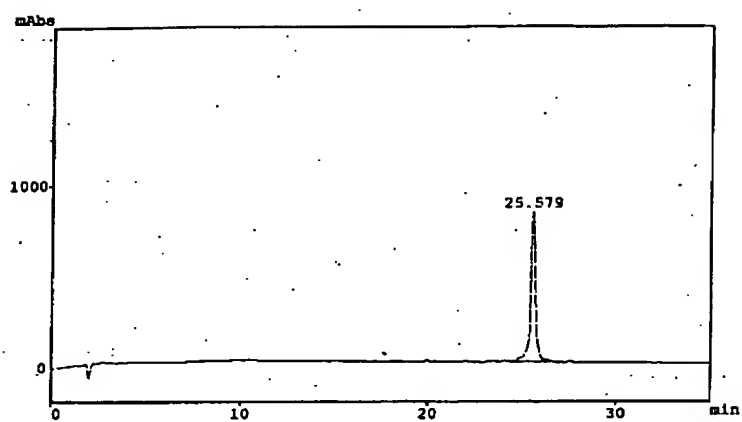
【図10】



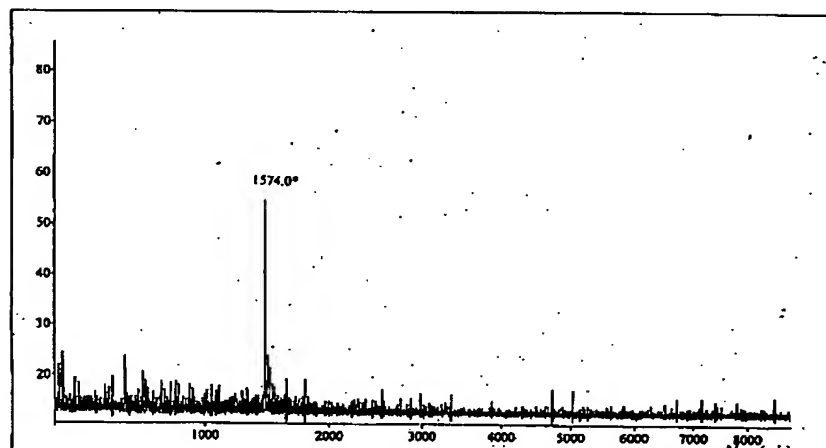
【図11】



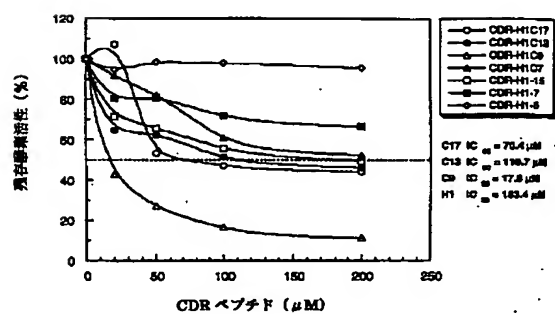
【図3】



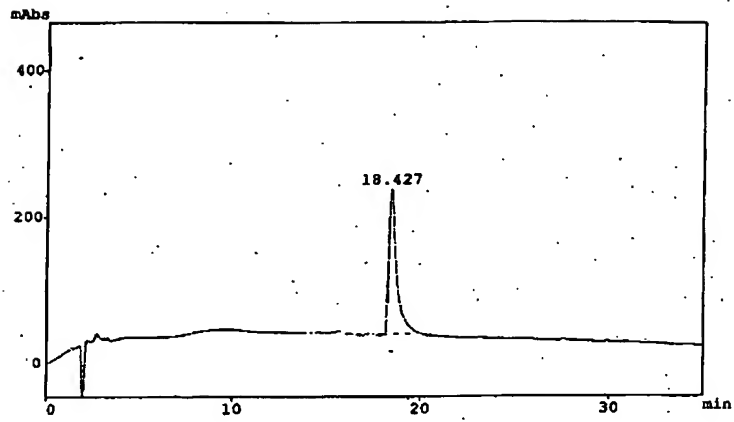
【図4】



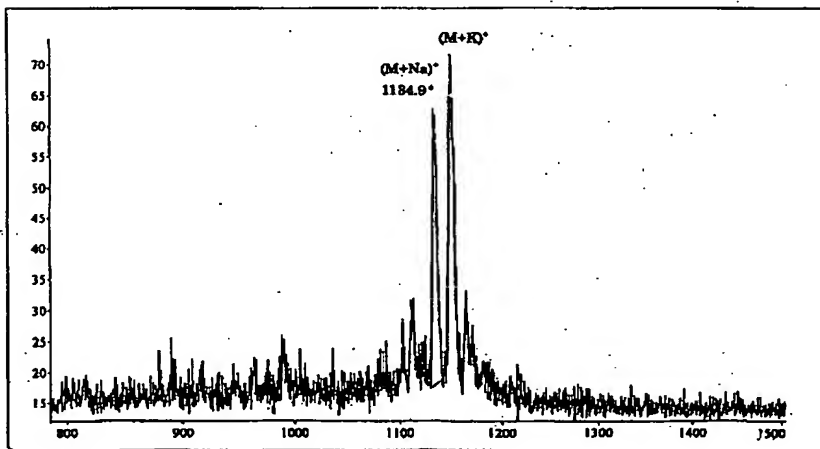
【図18】



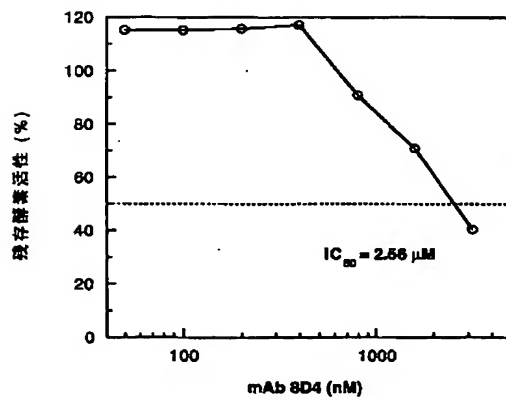
【図5】



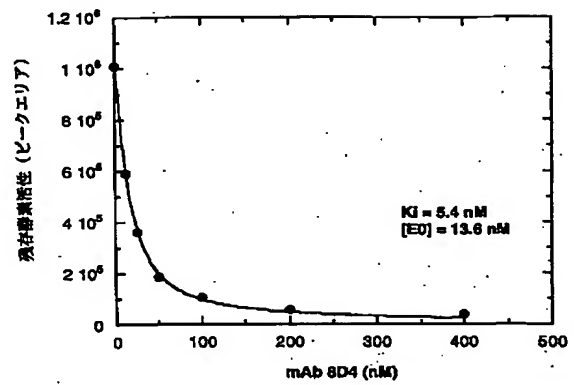
【図6】



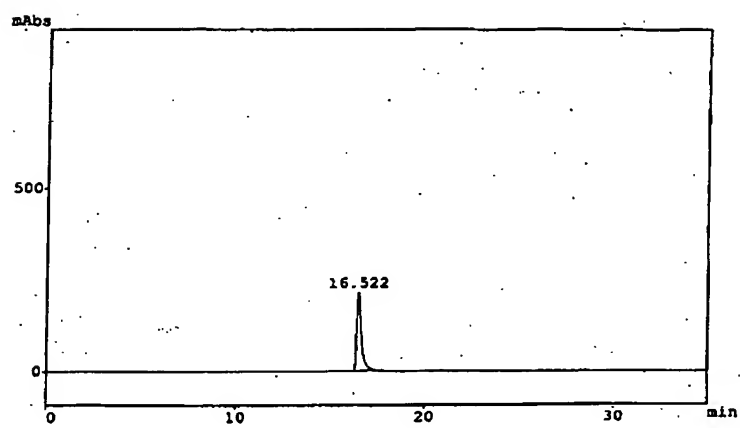
【図13】



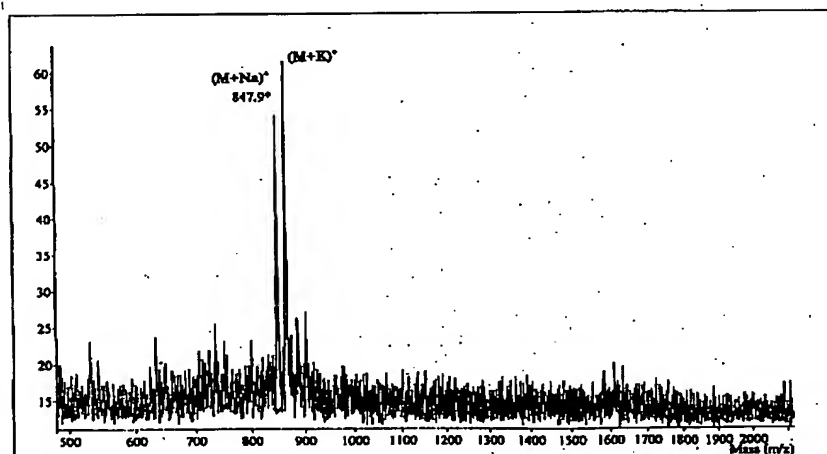
【図14】



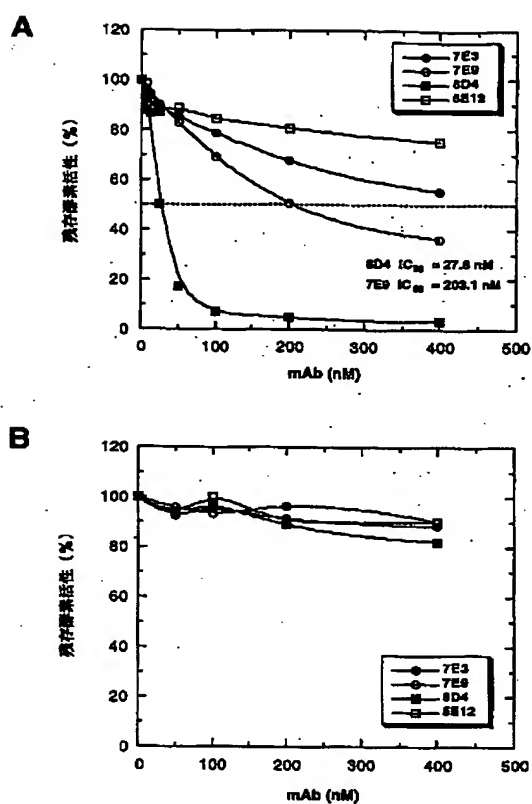
【図7】



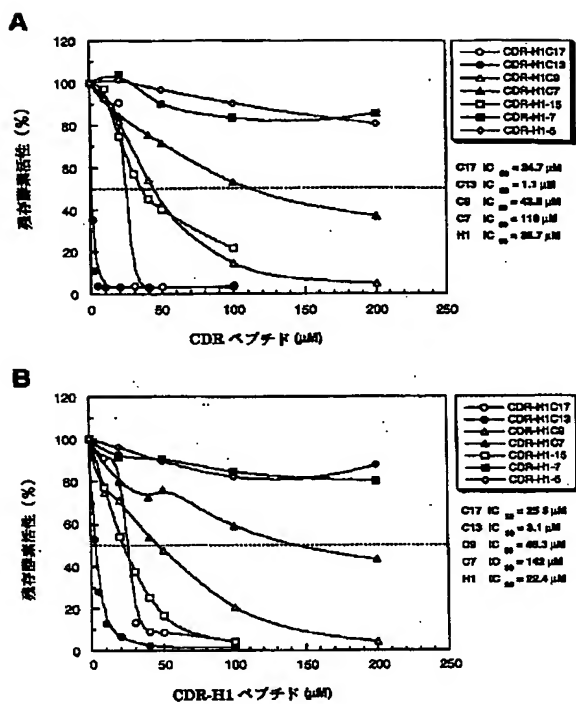
【図8】



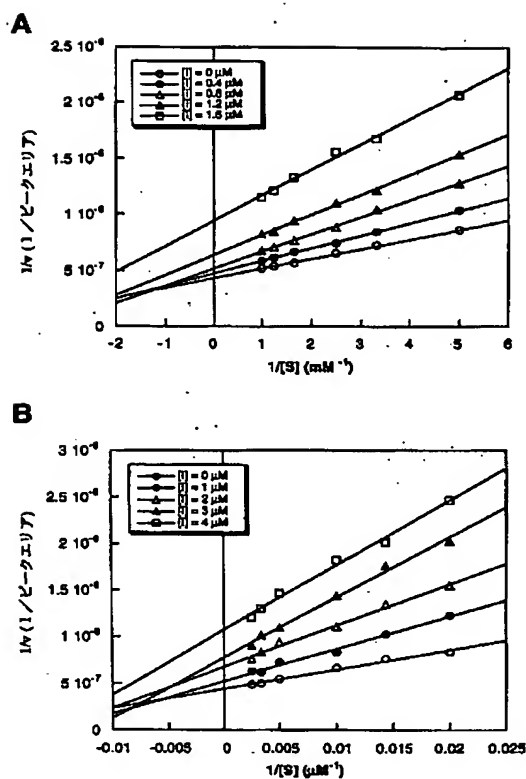
【図12】



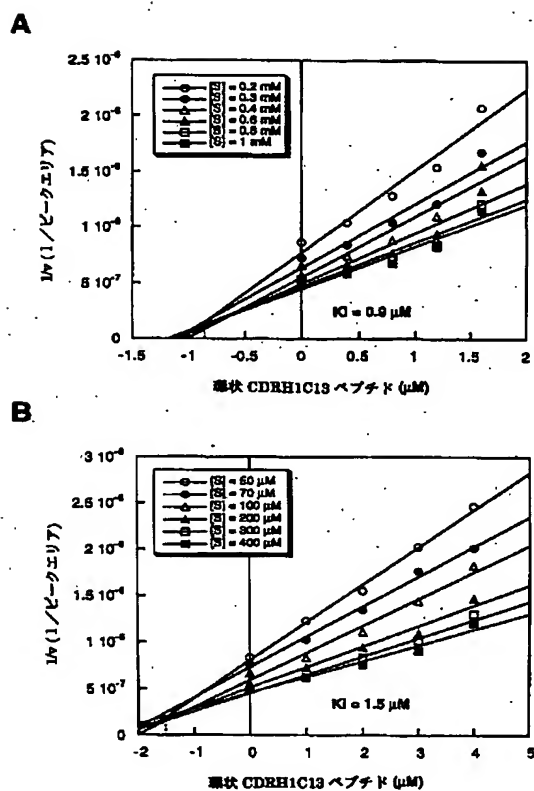
【図15】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

C 07 K 7/08

C 12 N 9/99

識別記号

F I

C 12 N 9/99

A 61 K 37/64

テーム (参考)

Fターム(参考) 4B064 AG37 BA09 BA10 CC24 DA01
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17
 BA18 BA26 CA53 CA59 DC32
 MA22 MA23 MA31 MA35 MA37
 MA41 MA43 MA44 MA52 MA56
 MA63 MA66 ZA752 ZB332
 ZC202
 4H045 AA10 AA30 BA15 BA16 BA32
 DA55 EA29 FA30 FA33 GA22